

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA

E. A. P. TECNOLOGÍA MÉDICA

**Frecuencia de anticuerpos anti-toxocara canis
detectados mediante la prueba de dot-ELISA en
pacientes que acudieron al Instituto de Medicina
Tropical "Daniel A. Carrión" durante el periodo 2006
- 2008**

TESIS

para optar por el título profesional de Licenciado en Tecnología Médica en
el área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica

AUTOR

Eduardo Manuel Cornejo Ruiz

ASESORA

Yrma Espinoza Blanco

Lima-Perú

2009

**Este trabajo fue realizado en el
Instituto de Medicina Tropical
“Daniel A. Carrión” de la
Facultad de Medicina- UNMSM**

*A mis padres,
por su constante guía y apoyo;
A mis hermanos,
por su apoyo incondicional.*

Agradecimientos

A la Prof. *Blgo. Yrma Espinoza Blanco* de la sección Científica de Parasitología, por su amistad, confianza y valiosa orientación que amablemente me supo brindar durante todo el desarrollo de este trabajo, muy agradecido.

Al Lic. *Tecnólogo Médico William Roldán Gonzáles*, por su amistad, confianza y valiosa cooperación que amablemente me supo brindar en todas las etapas de este trabajo, muy agradecido.

A la *Tec. Lab. Susana Jiménez* del Departamento Académico de Microbiología, por su amistad y apoyo en el desarrollo de este trabajo.

A mis amigos: *José Luis Quiñones* y *Arturo Huarcaya* por su valiosa amistad y constante apoyo.

A mis amigas: *Katherine Porras* y *Selene Bautista* por su valiosa amistad y constante apoyo.

Finalmente quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que de alguna forma colaboraron en la realización de ésta investigación y que sin su ayuda no hubiera sido posible la culminación de la misma.

INDICE

	Pág
RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN	8
1. MARCO TEÓRICO	
1.1. Antecedentes	10
1.2. Generalidades	11
1.2.1. Ciclos de Vida	12
1.2.2. Patología	13
1.2.3. Manifestaciones Clínicas	15
1.2.4. Respuesta Inmune	16
1.2.4.1. Mecanismos efectores	17
1.2.5. Diagnóstico	20
2. MATERIALES Y MÉTODOS	
2.1. Materiales	22
2.1.1. Material Biológico	22
2.1.2. Material de Laboratorio	22
2.2. Metodología	23
2.2.1. Dot-ELISA	23
RESULTADOS	25
DISCUSIONES	32
CONCLUSIONES	39
RECOMENDACIONES	40
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	41
ANEXOS	46

RESUMEN

Se realizó un estudio retrospectivo sobre la frecuencia de anticuerpos IgG anti-***Toxocara canis*** detectados mediante la prueba de dot-ELISA en pacientes que acudieron al Instituto de Medicina Tropical “Daniel A. Carrión” entre los años 2006 y 2008. El grupo de estudio estuvo conformado por 255 personas (128 varones y 127 mujeres) con un rango de edad entre 1 y 71 años. La frecuencia de anticuerpos anti-***Toxocara canis***, fue de 69,8%, siendo el grupo con mayor frecuencia los niños menores de 5 años. De los pacientes con prueba reactiva para anticuerpos IgG anti-***Toxocara canis***, 35,4% tenían un título de 200, 26,4% tenían un título de 400, 18,5% tenían título de 800, 19,1% tenían título de 1600 y 0,6% tenían título mayor a 1600. La asociación entre la serología para ***Toxocara canis*** y la presencia de perros y gatos resultó ser más significativa que la presencia de uno sólo de estos animales. (chi-cuadrado = 10,23; $p < 0.05$). Las personas cuya edad fluctuó entre los 15 y 44 años de edad y que tuvieron contacto con perros resultaron tener una probabilidad 171 veces mayor de tener una serología reactiva, en relación con otras personas que no tuvieron contacto con este animal ($OR = 171$, $p = 0.9942$).

Se concluye que la toxocariosis es una zoonosis de elevada frecuencia en nuestro medio y que el contacto con perros o gatos es uno de los principales factores que contribuyen a la transmisión de esta zoonosis.

Palabras Clave: ***Toxocara canis***, toxocariosis, serología, dot-ELISA, frecuencia, perros.

INTRODUCCIÓN

La toxocariosis humana es una zoonosis parasitaria cuyos agentes etiológicos más frecuentes son los estadíos larvales de ***Toxocara canis*** y ***Toxocara cati***, nemátodos ascarideos de perros y gatos y que accidentalmente infectan al hombre ⁽¹⁾. La infección se produce por la ingesta accidental de huevos larvados de éste nemátodo, produciéndose su liberación en el intestino y posterior migración hacia diferentes tejidos del cuerpo humano a través de los vasos sanguíneos ⁽²⁾. Las larvas migrantes pueden alcanzar el hígado, pulmones, corazón, pudiendo llegar incluso al sistema nervioso central y provocar cuadros de encefalitis o meningitis; y en otras oportunidades pueden localizarse en el globo ocular, produciéndose manifestaciones oculares como pérdida de la visión, fotofobia y ceguera. Este cuadro se denomina toxocariosis ocular y se observa en niños mayores, adolescentes y adultos ⁽³⁾. La toxocariosis es considerada un problema de salud mundial y es relativamente frecuente en zonas de climas templados y tropicales de todos los continentes; principalmente en el ámbito urbano y periurbano ⁽²⁾. En nuestro país se han realizado estudios acerca de la contaminación de áreas de uso público, en algunos casos los resultados obtenidos señalan la presencia de huevos de ***Toxocara canis*** en el 70,6% de los parques estudiados, encontrándose inclusive formas infectivas ^(3,4).

Muchas de las manifestaciones clínicas de la toxocariosis son muy parecidas a otras parasitosis, y por ello, es necesario realizar un diagnóstico serológico para confirmar la sospecha de ésta infección, y es necesario también conocer las variables sociales y ambientales relacionadas con los pacientes que se encuentren desarrollando esta infección.

Se han realizado estudios, en donde se evalúa la presencia de infección por larvas de ***Toxocara canis***, por diferentes métodos, incluso se han estandarizado nuevas metodologías para su diagnóstico ^(2,3,5,6), sin embargo este estudio nos permitirá estimar la frecuencia de esta parasitosis en pacientes que acuden al Instituto de Medicina Tropical “Daniel A. Carrión”, lo que representará una ayuda en el diagnóstico precoz, tratamiento oportuno y la prevención, tanto del paciente infectado como de la comunidad que le rodea. Teniendo en cuenta que ésta patología es un problema de salud pública a nivel mundial y especialmente nuestro país que se caracteriza por tener climas variados con una población canina numerosa que cohabita con las personas⁽⁷⁾, las que se encontrarían en constante riesgo de infección por el parásito y podrían desarrollar la enfermedad con graves consecuencias para la salud.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. ANTECEDENTES:

Se han realizado estudios serológicos mediante la prueba de ELISA en Argentina, donde se encontró que 20 de los 98 niños estudiados (20.4%) tenían anticuerpos contra el antígeno excretorio-secretorio de larva L2 de ***Toxocara canis***; y a su vez el análisis comparativo de los resultados mostró que el 55,6% de los niños con eosinofilia presentaban anticuerpos anti-***Toxocara*** y que el 100% de los niños seropositivos presentaban eosinofilia mayor al 10%⁽⁸⁾.

En otro estudio realizado en la ciudad de La Gran Resistencia, se encontró que el 91.7% de participantes en el estudio había tenido contacto con perros y/o gatos, el 30% tenía antecedentes de geofagia y el 86.7% vivía sobre calle de tierra. A pesar de que todos estos factores de riesgo se encuentran muy relacionados a la infección por ***Toxocara***, no se hallaron diferencias significativas al compararlo con el grupo de pacientes con serología negativa. ⁽⁹⁾ En el caso de la ciudad de Corrientes (Argentina), la prevalencia global de anticuerpos anti-***Toxocara*** fue de 67.7%. La seroprevalencia media de los niños que residían en viviendas familiares fue de 52.6%, con valores entre 46.5% y 60.9% ⁽¹⁰⁾. Otro estudio realizado en Argentina en población adulta encontró una prevalencia de seropositividad para ***Toxocara Canis*** del 38,9%, tampoco se encontró diferencia significativa entre hombres y mujeres. ⁽¹¹⁾ Agudelo et al realizó un estudio en la ciudad de Bogotá donde encontró una prevalencia de 46,5% de personas con títulos reactivos para ***Toxocara canis***, así mismo encontró que el 43,6% de las heces de los perros estudiados tenían huevos de ***Toxocara canis***.⁽¹²⁾

En el Perú se han realizado estudios de seroprevalencia mediante la prueba de ELISA ^(2,13), resultando reactivos el 16,0 % ⁽¹³⁾ y el 23,3%, mientras que 17,9% fueron calificados como sospechosos⁽²⁾; así mismo no hubo diferencias en cuanto al sexo, tampoco hubo asociación estadística entre el resultado de ELISA y la presencia de anemia, leucocitosis, eosinofilia o parásitos intestinales. Otro estudio realizado en nuestro país por Breña et al, también por método de ELISA, brindó una seroprevalencia para ***Toxocara canis*** del 46,5% en niños del distrito de San Juan de Lurigancho.⁽¹⁴⁾ Así mismo Espinoza et al. realizó un estudio en Lambayeque ⁽⁶⁾, donde encontró una seroprevalencia para ***Toxocara canis*** de 32,4% y también una asociación entre sexo masculino y serología reactiva. Al estudiar a la población de Cajamarca por método de dot-ELISA, Roldán et al. encontró una seroprevalencia de 44,92%, con una proporción significativamente alta en varones, además encontró que el 45,6% tuvieron síntomas respiratorios y sólo 13,23% tuvieron manifestaciones oculares.⁽¹⁵⁾

1.2. GENERALIDADES:

Toxocara canis y ***T. cati*** son helmintos ascarideos, parásitos naturales del intestino de los perros y los gatos que pueden infectar a los seres humanos de manera accidental, produciendo una enfermedad denominada toxocariosis. Los seres humanos se infectan con las formas larvarias del parásito después de ingerir huevos larvados de manera accidental a través de los suelos contaminados, manos sucias, vegetales, objetos contaminados, incluso se ha demostrado que el consumo de hígado de aves y vacunos mal cocidos o crudos podría aumentar el riesgo de infección por éste parásito ⁽¹⁶⁾. En el intestino, los huevos eclosionan liberando a las larvas que migran hacia el sistema sanguíneo y luego se distribuyen a cualquier

parte del organismo. Es interesante destacar que las larvas de **Toxocara** no evolucionan a formas adultas, como sucede en sus hospederos naturales (los perros y los gatos); en este caso el ser humano y otros mamíferos son denominados hospederos paraténicos.⁽¹⁷⁾ Se ha descrito también como causa del síndrome la contaminación con huevos de ascárides de animales salvajes como **Baylisascaris**⁽¹⁸⁾. Los parásitos adultos de **Toxocara canis** (que residen en el intestino de los cánidos y felinos) son similares al **Ascaris lumbricoides** del hombre, pero se diferencian de éste por presentar menor tamaño (5 a 10 cm. de longitud), menor diámetro y dos expansiones laterales de la cutícula en el extremo anterior, en forma de aletas. Los huevos miden 80 µm, son redondeados y con la cubierta externa en forma de mosaico. Las larvas, que son las únicas formas del parásito que afectan al hombre y a otros mamíferos diferentes de sus hospederos definitivos, miden aproximadamente 400 µm de longitud y tienen características morfológicas propias de la especie, que permite identificarlas en cortes seriados o al examen parasitológico, si se logran aislar⁽¹⁸⁾.

1.2.1.1. Ciclos de Vida

En el perro, como huésped definitivo de **Toxocara canis**, se reconocen dos tipos de ciclos; uno a partir de huevos que son eliminados en las materias fecales, estos huevos embrionan en la tierra e infectan al perro por vía oral, las larvas se liberan en el intestino y por vía sanguínea, migran hacia el hígado y pulmones; luego, siguen dos vías diferentes según la edad del perro infectado. En los cachorros menores de dos meses atraviesan los alvéolos pulmonares, ascienden a la faringe y son deglutidas para dar origen a futuros parásitos adultos en el intestino delgado, los que producirán miles de huevos y contaminarán el medio ambiente con

las heces del perro. Sin embargo, en los perros mayores las larvas llegan a la circulación arterial a partir del pulmón y se localizan en las vísceras en donde se producen granulomas ⁽¹⁸⁾.

El otro tipo de ciclo se da por vía transplacentaria. Las perras infectadas y en periodo de gestación pueden transmitir a sus fetos a través de la placenta debido a la capacidad migratoria que adquieren las larvas durante el embarazo, un hecho que tal vez se deba a la disminución de la inmunidad. De éste modo la infección en los perros recién nacidos es congénita ⁽¹⁸⁾.

En el hombre y en otros mamíferos (diferentes de los cánidos y felinos), el ciclo de vida del parásito es incompleto. Este se inicia al ingerir huevos embrionados del parásito de manera casual donde las larvas se liberan en el intestino atraviesan el epitelio y luego alcanzan los vasos sanguíneos; a través de ellos, las larvas pueden llegar hacia los diferentes órganos y tejidos, incluyendo al hígado pulmones, corazón, ojos y el sistema nervioso central (SNC). En este caso, las larvas de ***Toxocara*** no se desarrollan a parásitos adultos y quedan restringidas a su forma larval. ⁽¹⁸⁾

1.2.2. Patología

Los órganos más afectados en orden de frecuencia son: hígado, pulmones, cerebro, ojos y ganglios. En ellos, con excepción del SNC, se forman granulomas de cuerpo extraño con infiltración eosinofílica. Las larvas se rodean progresivamente de tejido fibroso y pueden llegar a calcificarse ⁽¹⁸⁾.

El hígado se encuentra aumentado de tamaño presentando granulomas, algunas veces palpables o visibles como granulaciones diminutas de aproximadamente medio milímetro. En los pulmones existe exudado inflamatorio con pequeñas consolidaciones, las que al examen microscópico muestran abundantes eosinófilos y cristales de Charcot-Leyden. En el cerebro las larvas actúan como focos irritativos, produciendo lesiones similares a pequeños tumores. Mediante el estudio post-mortem se han observado canales microscópicos dejados por las larvas, las cuáles generalmente no se encapsulan. Además, se pueden observar pequeñas áreas de necrosis con poca inflamación ⁽¹⁸⁾ e incluso el paciente manifiesta ataxia, rigor y alteraciones neuropsicológicas ⁽¹⁹⁾.

En el ojo, las larvas de ***Toxocara*** producen endoftalmitis y lesiones granulomatosas con predominio en el segmento posterior, que simulan un retinoblastoma. Se producen también inflamación del vítreo, donde se pueden detectar anticuerpos, lo cual contrasta con la frecuente ausencia de estos anticuerpos en suero. También pueden producir desprendimientos de retina. Estas lesiones oculares se han descrito principalmente en niños de 5 a 15 años y la mayoría se basan en estudios anatomopatológicos de ojos enucleados, en los cuales existían lesiones cicatriciales correspondientes a las etapas tardías de las reacciones a los antígenos de los parásitos en destrucción. A la patología específica descrita, se asocian otros hallazgos, como hipereosinofilia persistente, excepto en localización exclusivas del ojo o SNC, hipergammaglobulinemia y adenopatías ⁽¹⁸⁾ aunque otros estudios no encuentran relación entre eosinofilia y la presencia de anticuerpos anti-***Toxocara canis*** ⁽²⁰⁾.

1.2.3. Manifestaciones Clínicas

Las manifestaciones clínicas afectan en su mayoría a niños en edad preescolar; el grado de afección clínica depende del número de larvas, su distribución tisular, reinfección y respuesta inmune del hospedero. La mayoría de las infecciones son asintomáticas y puede manifestarse solo por eosinofilia sanguínea ⁽²¹⁾.

La sintomatología en niños cuando presentan invasión visceral es principalmente pulmonar, con cuadros bronquiales catarrales, crisis asmáticas o neumonía. Se encuentra tos, expectoración y estertores diseminados. En muchos casos hay fiebre y gran malestar.

Una segunda variación del síndrome se caracteriza por fiebre prolongada, que puede acompañarse de sintomatología pulmonar, adenopatías, dolores articulares, visceromegalias, etc. ⁽¹⁸⁾.

La tercera forma está caracterizada por el predominio de hepatomegalia, con cambios ecográficos del hígado, que puede ser dolorosa y acompañarse de esplenomegalia. En ésta presentación se asocia frecuentemente malestar general y cualquiera de los síntomas mencionados en las otras formas ⁽¹⁸⁾.

Un motivo frecuente de consulta es el aumento de los eosinófilos circulante, que puedan sobrepasar el 50%. Esta hipereosinofilia puede hacer sospechar el origen parasitario de la patología. Es muy frecuente encontrar parasitismo intestinal múltiple en estos pacientes, como también infecciones bacterianas agregadas ⁽¹⁸⁾.

Cuando existe un compromiso neurológico, se encuentra un cuadro variado que puede incluir síntomas de déficit neuropsiquiátrico, epilepsia de pequeño y gran mal, un cuadro de encefalitis o meningitis o sintomatología de tumoración intracraneal⁽¹⁸⁾.

En la toxocariosis ocular se observan alteraciones de la visión o pérdida de ésta, lo cual puede pasar desapercibido en los niños menores. En algunos casos se encuentra la sintomatología correspondiente a desprendimiento de retina. Se han descrito cuatro síndromes clínicos:

1. Granulomas periféricos que comprometen la retina.
2. Una lesión levantada en el polo posterior.
3. Endoftalmitis difusa.
4. Papilitis.

A veces se observan lesiones múltiples debidas a una sola larva. Rara vez se hace el diagnóstico etiológico en las formas oculares, debido a que no se observan las larvas al examen oftalmológico.⁽¹⁸⁾

1.2.4. Respuesta inmune

El desarrollo de una enfermedad infecciosa en un individuo supone complejas interacciones entre los microorganismos y el huésped. En la terminología de las enfermedades infecciosas, una infección parasitaria es la producida por parásitos animales tales como protozoos, helmintos y ectoparásitos. En la actualidad, estos parásitos son responsables de una morbilidad y una mortalidad superiores a las

generadas por cualquier otra clase de microorganismos infecciosos, sobretudo en los países en vías de desarrollo. La mayoría de los parásitos tienen ciclos vitales complejos, una parte de ellos tienen lugar en el ser humano, mientras que el resto depende de huéspedes intermedios. El ser humano suele infectarse a través de picaduras de huéspedes intermedios o al compartir un mismo hábitat determinado.

(22)

Los helmintos parásitos son de un tamaño considerablemente mayor que las bacterias y los virus, por lo que poseen una mayor variedad y cantidad de antígenos.⁽²³⁾ Los parásitos que presentan ciclos vitales complejos pueden expresar determinados antígenos solamente en una de las fases de su desarrollo, lo que da lugar a la existencia de respuestas específicas de fase.

1.2.4.1. Mecanismos Efectores

La primera línea de defensa está formada por los macrófagos, los neutrófilos, los eosinófilos y las plaquetas.

Los anticuerpos y las citocinas producidos en las respuestas específicas a los antígenos parasitarios potencian la actividad antiparasitaria de éstas células efectoras. Sin embargo, los macrófagos tisulares, los monocitos y los granulocitos poseen una cierta actividad intrínseca incluso en ausencia de una estimulación previa.⁽²³⁾ Niveles elevados de IgG específica (IgG1, IgG 2, IgG 4) están asociados con los síntomas de LMV pero no con toxocariosis ocular. La subclase predominante IgG específica en ambas es IgG1, seguido por IgG2, IgG3 e IgG4. IgG1 participa en las reacciones de anticuerpos dependientes de la citotoxicidad

mediada por células, lo que resulta en inflamación debido a la eficaz limpieza de los parásitos. Por otra parte, también la IgG4-TES específica es más prominente en los pacientes sintomáticos para larva migrans visceral. La IgG4 no coopera en las reacciones de anticuerpos dependientes de la citotoxicidad mediada por células, ya que no pueden fijar complemento. Dada la persistencia de los síntomas, la elevación de los niveles de IgG puede ser inducida más probablemente a largo plazo de la estimulación del sistema inmune por el parásito. ⁽²⁴⁾

Antes de actuar como células presentadoras de antígenos iniciadoras de la respuesta inmunitaria, los macrófagos actúan como células efectoras, inhibiendo la multiplicación de los parásitos o incluso destruyéndolos. Además, secretan moléculas que regulan la respuesta inflamatoria. Algunas de éstas moléculas (IL-1, IL-12, $\text{TNF}\infty$ y los factores estimulantes de colonias, CSF) potencian la respuesta inmunitaria al activar otras células o inducir su proliferación. ⁽²³⁾ La respuesta inmune puede ser intensa y los anticuerpos séricos pueden permanecer altos durante años, al igual que las isohemaglutininas anti-A y anti-B. ⁽⁸⁾

Los eosinófilos están típicamente asociados a las infecciones por helmintos. Se ha sugerido que los eosinófilos evolucionaron como sistema de defensa específico frente a las fases tisulares de aquellos parásitos cuyo excesivo tamaño impide que puedan ser fagocitados, y que las reacciones de mastocitos dependientes de IgE han evolucionado para atraer a los eosinófilos hacia el parásito y estimular sus propiedades antiparasitarias. ⁽²³⁾ La eosinofilia y el incremento en los niveles de IgE observados en los casos de LMV y de toxocariosis encubierta se deben al aumento numérico y de actividad de las células linfocitarias Th2 y a la

disminución de las Th1. La subsecuente acción de la Interleuquina 4 amplifica la producción de IgE y la Interleuquina 5 facilita el crecimiento y la diferenciación de eosinófilos. ⁽¹⁾

Las células T colaboradoras pueden pertenecer a dos subpoblaciones diferentes, Th1 y Th2. En las fases iniciales de una infección es posible encontrar una mezcla de los dos tipos de células, el equilibrio entre ambas se puede modificar según el tiempo o la edad, y suele inclinarse hacia una de ellas cuando la enfermedad persiste durante un periodo prologando de tiempo. Las citocinas de las células Th1 y Th2 son mutuamente antagonistas, por lo que la evolución de la enfermedad dependerá de la subpoblación de células T que predomine finalmente (esto depende en gran medida del parásito implicado, y en algunas ocasiones puede ser impredecible). ⁽²³⁾

En algunas infecciones parasitarias el sistema inmunitario no es capaz de erradicar completamente al parásito y trata de aislar al organismo con células inflamatorias. El organismo del huésped reacciona frente a los antígenos liberados localmente, con la consiguiente estimulación de la liberación de citocinas que atraen células hacia esa región. ⁽²³⁾

En el curso de muchas infecciones parasitarias se produce una hipergammaglobulinemia inespecífica, debida probablemente a sustancias liberadas por los parásitos que actúan como mitógenos de las células B. Las concentraciones totales de inmunoglobulinas son altas. ⁽²³⁾

1.2.5. Diagnóstico

Las técnicas de imagen puede utilizarse para detectar y localizar lesiones granulomatosas debido a larvas de **Toxocara**.⁽²⁵⁾

Cualquier paciente pediátrico con una enfermedad febril inexplicada y eosinofilia debe ser sospechoso de un síndrome de Larva Migrans Visceral (LMV). La hepatoesplenomegalia y las pruebas de enfermedad multisistémica junto a la historia de pica, pueden hacer el diagnóstico presuntivo de LMV. Del mismo modo, una toxocariosis ocular (TO) se debe sospechar en cualquier niño con visión unilateral pérdida y estrabismo.⁽²⁶⁾

Una eosinofilia en sangre periférica, aunque no específica para infección por **Toxocara**, ha sido constantemente asociada con LMV⁽¹⁹⁾. En algunos estudios sólo el 39% de los niños con serología positiva tuvo una ligera o moderada eosinofilia⁽⁶⁾.

Otros indicadores de infección incluyen hipergammaglobulinemia y un elevado titulo de isohemaglutinina. Por lo tanto, una correlación de la enfermedad con la clínica se ha descrito anteriormente, una historia de pica, eosinofilia, y serología positiva, son el punto fuerte para el diagnóstico. Una biopsia hepática puede revelar un granuloma en torno a una larva, pero el éxito de diagnóstico utilizando este enfoque es fortuito y en el mejor de los casos ya no se recomienda.

(26)

El método comúnmente utilizado para el diagnóstico es la prueba de ELISA para la búsqueda de anticuerpos anti-**Toxocara** en pacientes con sospecha clínica

de toxocariosis. Para el diagnóstico se usa el antígeno excretor secretor producido por las larvas de ***T. canis*** (TES) mantenidas in vitro aumenta todavía más la especificidad de la prueba ELISA. ⁽²⁵⁾ Se han realizado estudios comparando el ELISA con el dot-ELISA y se observó que este último también tenía una sensibilidad del 100% y una especificidad del 95%. ⁽⁵⁾

Una prueba ELISA reactiva para ***Toxocara*** puede ser confirmada por Western Blot (WB), tan sensible como el ELISA, pero más específica, mostrando la presencia de las bandas diagnósticas de 24 a 35 kDa. ⁽²⁵⁾

También se ha demostrado que el humor vítreo u acuoso puede ser de mayor utilidad cuando se sospecha de una toxocariosis ocular. El título de anticuerpos anti-***Toxocara*** en estos fluidos puede resultar ser más elevado que en el suero. Incluso se han reportado casos de toxocariosis ocular con serología negativa. ⁽²⁵⁾

Actualmente la mejor opción para el serodiagnóstico es utilizar el ELISA IgG-TES como una prueba de selección (con la confirmación del ELISA IgE-TES) y el Western Blot TES. El aumento de la especificidad se puede lograr mediante el uso de un ELISA para IgG4-TES y un WB IgG4-TES también podría ser útil, ya que podría proporcionar una mayor discriminación después del ELISA IgG-TES. ⁽²⁷⁾

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. MATERIALES

2.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO

El estudio se llevó a cabo con un total de 255 muestras de suero de pacientes que acudieron a realizarse la prueba de dot- ELISA para el diagnóstico de toxocariosis durante el periodo 2006- 2008, dichos sueros fueron proporcionados por el laboratorio de toxocariosis de la Sección Científica de Parasitología del Instituto de Medicina Tropical “Daniel A. Carrión”, de los cuales 128 (50.2%) pacientes son varones y 127 (49,8%) son mujeres; cuyas edades fluctuaban entre 1 y 71 años.

2.1.2. MATERIAL DE LABORATORIO

Previa coordinación con la Sección Científica de Parasitología del Instituto de Medicina Tropical “Daniel A. Carrión”, se obtuvo la ficha de datos de los pacientes que acudieron a realizarse la prueba de dot-ELISA para el diagnóstico de toxocariosis durante el periodo 2006- 2008 para observar las características de la población estudiada.(Anexo 3)

Así mismo la Sección Científica de Parasitología del Instituto de Medicina Tropical “Daniel A. Carrión” proporcionó todos los materiales necesarios para la realización de la prueba de dot-ELISA.

2.2. METODOLOGÍA

2.2.1. DOT-ELISA

En el presente estudio se utilizó para el diagnóstico serológico de la toxocariosis humana el procedimiento descrito por Roldan et al ⁽⁵⁾. en donde tiras de papel de Nitrocelulosa (Sigma), 1 cm de ancho y 6 cm de largo se colocaron sobre una placa de ELISA de 96 pocillos y después de una ligera presión aparecieron zonas circulares marcadas. Dos microlitros de antígeno TES a una concentración de 0.01ug/ mL fueron colocadas por separado en cada circulo. Después del secado, los sitios libres fueron bloqueados por 18 h de incubación a 4 ° C en 0,01 M de buffer fosfato salino (PBS), pH 7,2 con 5% de leche descremada. Luego, las tiras se lavaron 3 veces (5 min / lavado) con PBS conteniendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T). Doce microlitros de suero diluido desde 1:200 a 1:1600 con PBS-T conteniendo leche descremada al 5% fueron probados para determinar el título del suero del paciente. Después de 45 minutos a temperatura ambiente, se lavaron como se ha descrito anteriormente y se incubaron con anticuerpo de cabra anti-IgG humana-conjugado con peroxidasa (Sigma) a una dilución de 1:1000 dilución durante 45 minutos a temperatura ambiente. Las tiras se lavaron exhaustivamente como ya fue descrito y luego fueron sumergidas en una solución recién preparada de sustrato-cromógeno, que consistió en buffer Citrato 0.01M, pH 5.0, conteniendo peróxido de hidrógeno (0,01%) y 0,5 mg de 3,3 - Diaminobencidina (Sigma) por mililitro y en 0,01 M durante 5 minutos. La reacción se detuvo por un lavado con agua de caño y finalmente se dejaron secar para proceder a la lectura de los resultados. El desarrollo de puntos o manchas definidas de color marrón en la zona donde se encontraba el antígeno fue considerado como una reacción positiva, mientras que su ausencia fue considerada como una reacción negativa. (Anexo 4) La aparición de

los puntos o manchas definidas en las diluciones seriadas determinó el título del suero, en referencia al control negativo.

RESULTADOS

La figura 1 muestra el resultado de la población estudiada donde se observa que 178 (69,8%) pacientes presentaron títulos diagnósticos, 77 (30,2%) pacientes tuvieron serología no reactiva.

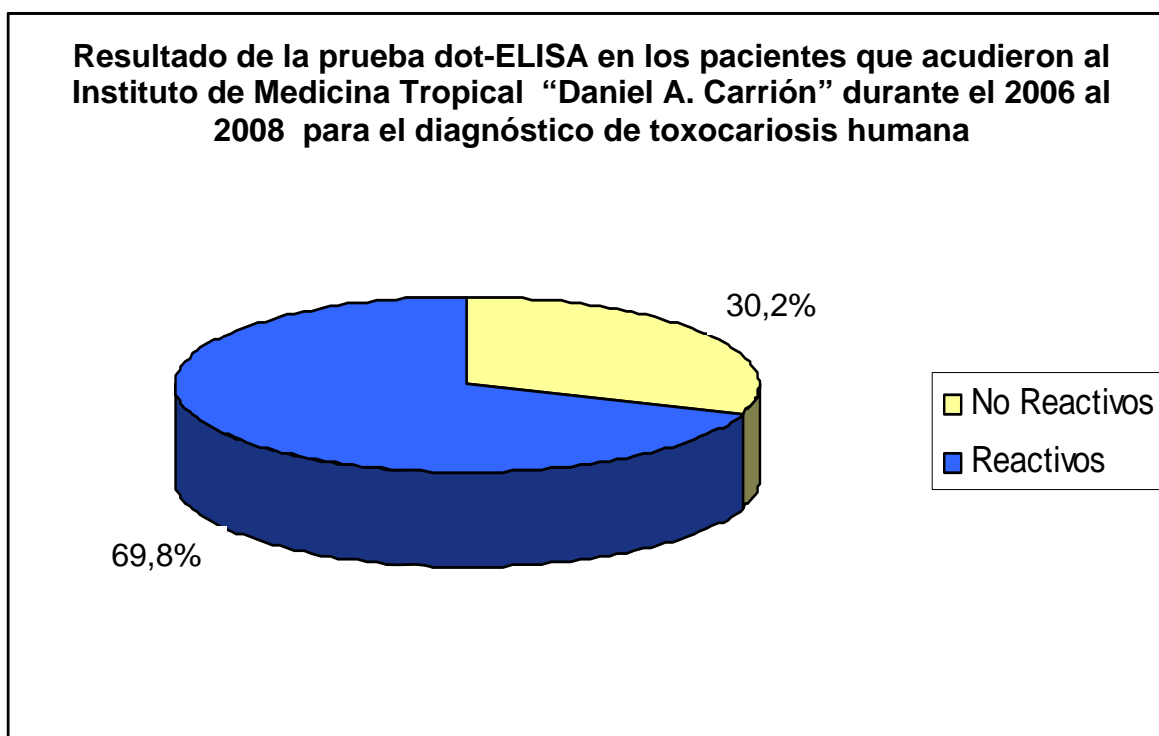


Figura 1

La distribución de la población por grupos etáreos fue la siguiente: 17 (6,7%) estaban entre 1 y 4 años, 102 (40,0%) entre 5 y 14 años, 92 (36,1%) entre 15 y 44 años, 32 (12,5%) entre 44 y 60 años y 12 (4,7%) eran mayores de 60 años. (Figura 2)

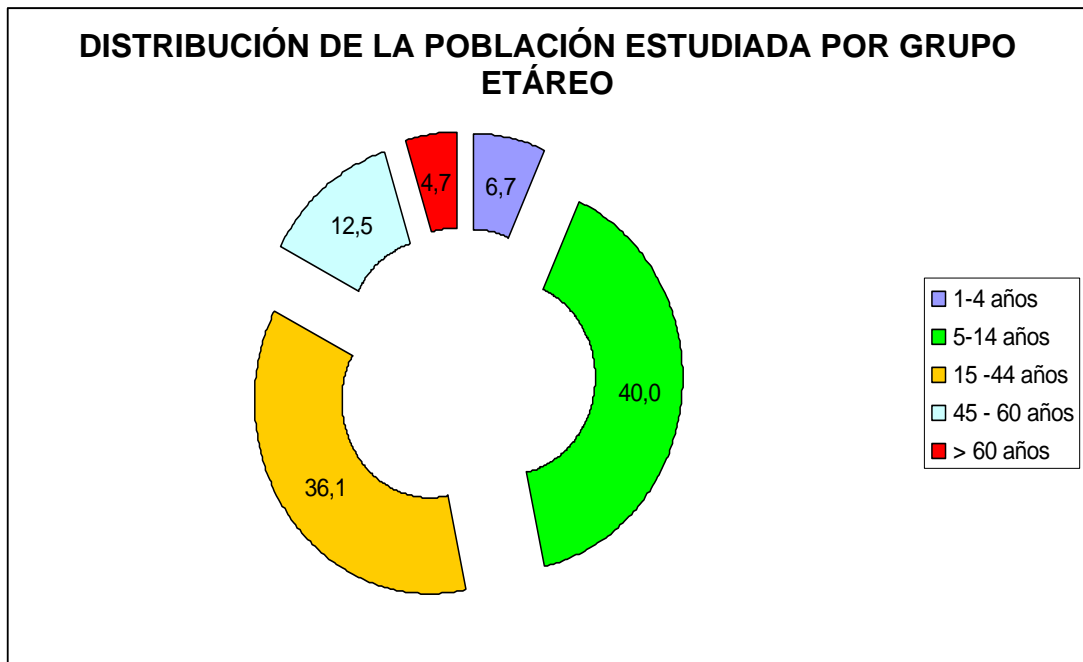


Figura 2

Los títulos serológicos de los pacientes que resultaron reactivos para la prueba de dot-ELISA se muestran en la figura 3, donde se observa que están distribuidos de la siguiente manera: 63 (35,4%) pacientes con un título de 200, 47 (26,4%) con un título de 400, 33 (18,5%) con un título de 800, 34 (19,1%) con un título de 1600 y 1 (0,6%) paciente tuvo un título superior a 1600.

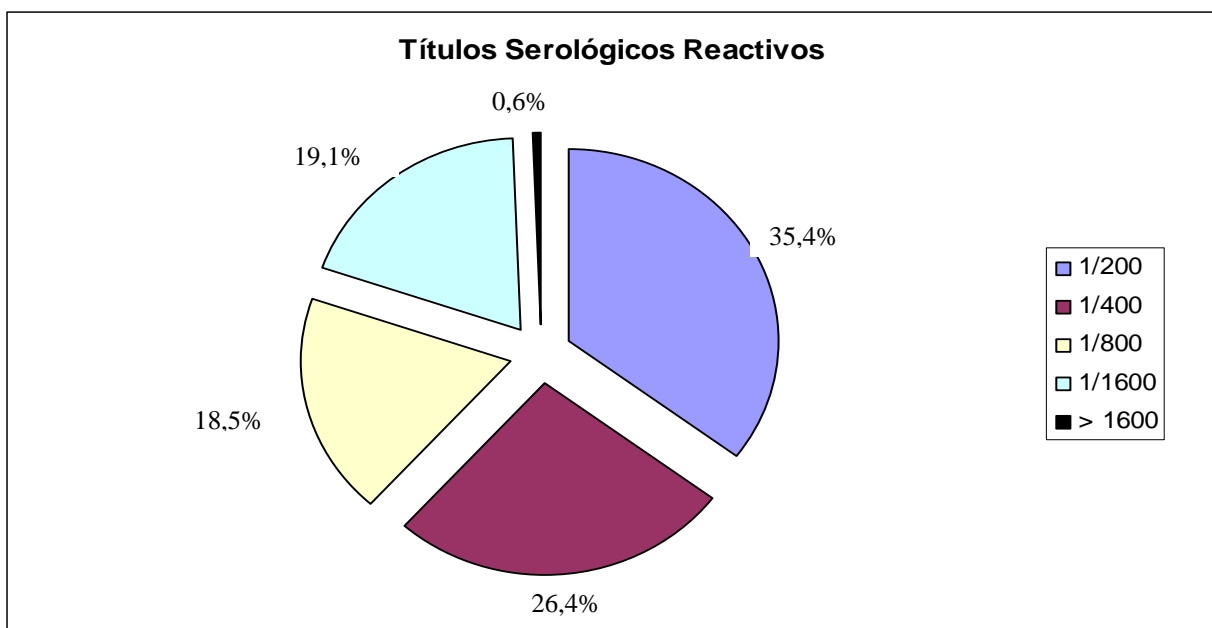


Figura 3

Se obtuvieron datos de los pacientes con serología reactiva de acuerdo a su grupo etáreo (Figura 4), encontrándose que el 88,2% correspondía a niños entre 1 y 4 años, 70,6% a pacientes entre 5 y 14 años, el 68,5% a pacientes entre 15 y 44 años, el 71,9% a pacientes entre 45 y 60 años y el 41,7% a personas mayores de 60 años.

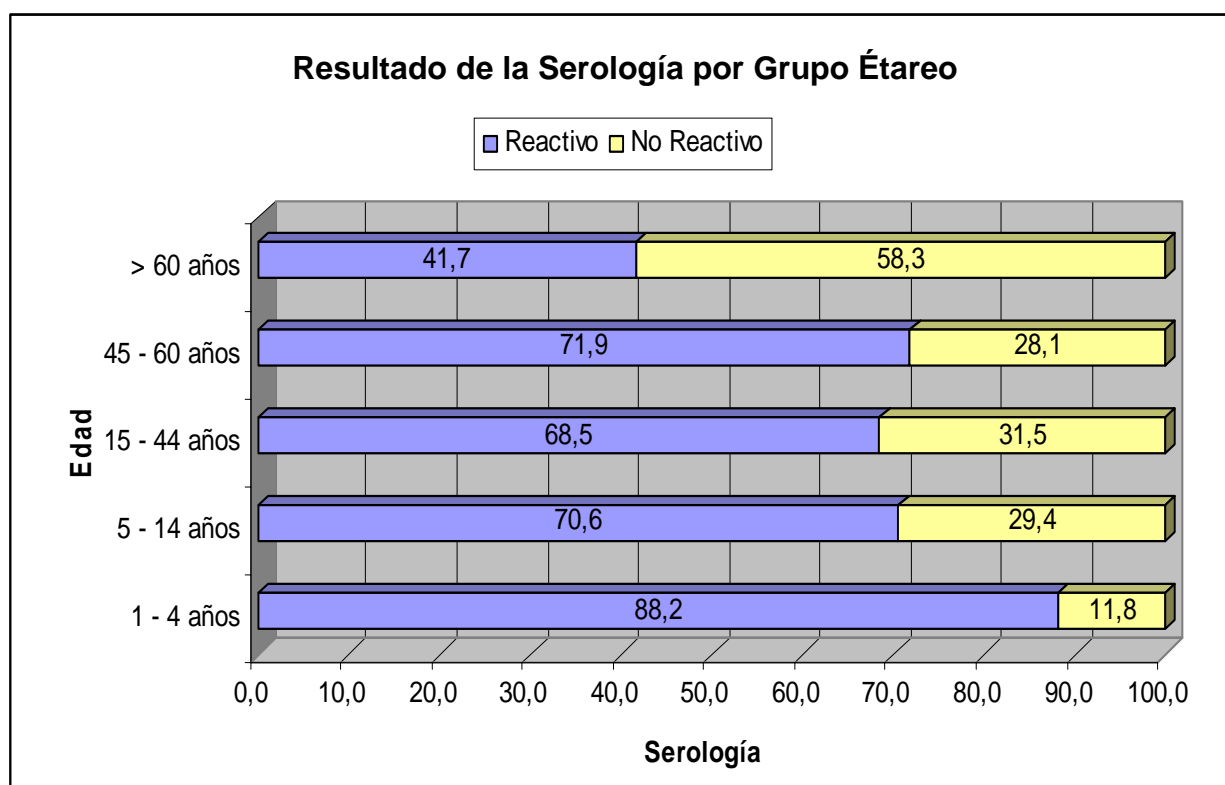


Figura 4

En el cuadro 1 se observa que los pacientes con sintomatología ocular fueron lo que acudieron para el diagnóstico serológico y se destacó que 142 (55,7%) de ellos tuvieron disminución de la agudeza visual, 100 (39,2%) prurito ocular interno, 91 (35,7%) visión borrosa, 82 (32,2%) fotofobia, 74 (29%) lagrimeo y 22 (8,6%) estrabismo. También se puede apreciar que 43 (16,9%) tuvieron problemas de asma, 24 (9,4%) eosinofilia y 40 (15,7%) fueron asintomáticas. Cabe resaltar que en la mayor parte de casos los pacientes presentaban más de una sintomatología.

Cuadro 1
Sintomatología presentada por los Pacientes que acudieron al Instituto de Medicina Tropical “Daniel A. Carrión” para el serodiagnóstico de Toxocariosis

Síntomas	Pacientes	%
Disminución de la agudeza visual	142	55,7
Prurito ocular interno	100	39,2
Visión Borrosa	91	35,7
Fotofobia	82	32,2
Lagrimo	74	29,0
Erupción y prurito de la piel	43	16,9
Asma	43	16,9
Eosinofilia	24	9,4
Estrabismo	22	8,6
Alergias	10	3,9
Asintomáticos	40	15,7

Se pudo obtener datos de la serología para ***Toxocara canis*** de acuerdo a los distintos lugares de procedencia de las personas del estudio, el cuadro 2 muestra las serologías de acuerdo a los departamentos de procedencia; en algunos de ellos se observa que la serología reactiva sobrepasa el 50% y en otros llega al 100%.

Cuadro 2
Resultado de la Serología presentada por los pacientes que acudieron al
Instituto de Medicina Tropical “Daniel A. Carrión” para el serodiagnóstico de
Toxocariosis según el Departamento de Procedencia

Ciudad			No			
	Reactivos	%	Reactivos	%	Total	%
Amazonas	1	33,3	2	66,7	3	100,0
Ancash	6	85,7	1	14,3	7	100,0
Apurímac	2	100,0	0	0,0	2	100,0
Arequipa	1	100,0	0	0,0	1	100,0
Cajamarca	6	85,7	1	14,3	7	100,0
Callao	14	73,7	5	26,3	19	100,0
Cusco	2	100,0	0	0,0	2	100,0
Extranjero	0	0,0	2	100,0	2	100,0
Huancavelica	1	100,0	0	0,0	1	100,0
Huanuco	1	33,3	2	66,7	3	100,0
Ica	4	80,0	1	20,0	5	100,0
Junín	2	66,7	1	33,3	3	100,0
La Libertad	1	100,0	0	0,0	1	100,0
Lambayeque	5	100,0	0	0,0	5	100,0
Lima*	119	68,0	56	32,0	175	100,0
Loreto	2	40,0	3	60,0	5	100,0
M de Dios	1	50,0	1	50,0	2	100,0
Pasco	0	0,0	1	100,0	1	100,0
Piura	4	80,0	1	20,0	5	100,0
San Martín	2	100,0	0	0,0	2	100,0
Ucayali	3	100,0	0	0,0	3	100,0
Tacna	1	100,0	0	0,0	1	100,0
TOTAL	178	69,8	77	30,2	255	100,0

* Se incluyen las provincias de Lima.

El cuadro 3, muestra la serología de acuerdo al distrito de procedencia (Lima), donde se puede observar que ocurre algo similar a lo ocurrido en los

distintos departamentos, donde la serología reactiva en algunos casos sobrepasa el 50% y en otros casos también llega al 100%.

CUADRO 3
Resultado de la Serología de los pacientes que acudieron al Instituto de Medicina Tropical “Daniel A. Carrión” para el diagnóstico de Toxocariosis según el Distrito de Procedencia

Distrito	Reactivos	%	No Reactivos	%	Total	%
Ancon	1	50,0	1	50,0	2	1,1
Ate	2	66,7	1	33,3	3	1,6
Breña	1	100,0	0	0,0	1	0,5
Callao*	14	73,7	5	26,3	19	10,2
Carabayllo	0	0,0	2	100,0	2	1,1
Collique	1	100,0	0	0,0	1	0,5
Comas	4	100,0	0	0,0	4	2,2
Chaclacayo	1	100,0	0	0,0	1	0,5
Chorrillos	0	0,0	2	100,0	2	1,1
Chosica	0	0,0	1	100,0	1	0,5
El Agustino	2	40,0	3	60,0	5	2,7
Independencia	1	50,0	1	50,0	2	1,1
Jesus María	2	100,0	0	0,0	2	1,1
La Molina	1	100,0	0	0,0	1	0,5
La Victoria	3	100,0	0	0,0	3	1,6
Lima	14	53,8	12	46,2	26	14,0
Lince	2	66,7	1	33,3	3	1,6
Los Olivos	8	66,7	4	33,3	12	6,5
Magdalena	0	0,0	1	100,0	1	0,5
Miraflores	1	100,0	0	0,0	1	0,5
Pblo. Libre	3	100,0	0	0,0	3	1,6
Puente Piedra	1	100,0	0	0,0	1	0,5
Rimac	4	100,0	0	0,0	4	2,2
San Borja	3	50,0	3	50,0	6	3,2
San Luis	1	50,0	1	50,0	2	1,1
San Miguel	6	85,7	1	14,3	7	3,8
SJL	6	46,2	7	53,8	13	7,0
SJM	8	100,0	0	0,0	8	4,3
SMP	15	65,2	8	34,8	23	12,4
Sta Anita	4	66,7	2	33,3	6	3,2
Surco	2	50,0	2	50,0	4	2,2
Surquillo	5	83,3	1	16,7	6	3,2
VES	6	75,0	2	25,0	8	4,3
VMT	3	100,0	0	0,0	3	1,6
Total	125	100,0	61	100,0	186	100,0

* Se incluyen los distritos de Bellavista, Callao y Ventanilla.

Nota: El cuadro no considera las provincias de Lima.

En el cuadro N° 4 se muestran los resultados al aplicar el Odds Ratio (OR), en donde se puede determinar la posesión de gatos o perros como factor de riesgo para la infección con ***Toxocara canis***, así mismo, se observa que las personas entre 5 y 14 años que tuvieron contacto con cánidos tienen 114 veces mas probabilidad de tener serología positiva que aquellos que no tuvieron contacto con dichos animales. También se observa que para el caso de las personas entre 15 y 44 años, que tuvieron contacto con cánidos tienen 171 veces mas probabilidad de tener serología reactiva que aquellos que no tuvieron contacto con dichos animales. A su vez las personas entre 45 y 60 años que tuvieron contacto con cánidos tienen 11 veces mas probabilidad de tener serología positiva que aquellos que no tuvieron contacto con dichos animales.

Cuadro 4
Distribución del OR por Grupo Etéreo

Edad	OR Perros	OR Gato	OR Ambos
1-4 años	0	0	0
5-14 años	114	11,3	168
15 -44 años	171,1	0	48,9
45 - 60 años	16,8	0	10,8
> 60 años	10	0	10

DISCUSIÓN

La frecuencia total de serología reactiva a través de la prueba dot-ELISA fue del 69,8%, un valor relativamente similar a lo encontrado por Lopez et al ^(9,10) en Argentina donde la serología fluctuó entre 58% y el 67%; y en Corea ⁽¹⁵⁾ que fue del 65%; pero marcadamente superior en relación a las encontradas por Espinoza et al ^(2,6), Roldan et al ⁽²¹⁾, en Perú y Taranto ⁽⁸⁾ en el Chaco Salteño en Argentina.

Es importante considerar que el dot-ELISA es una prueba cualitativa porque nos permite evaluar la respuesta inmunológica a las larvas de ***Toxocara canis*** y semicuantitativa porque nos permite determinar el título serológico, para evaluar en cierta medida, el grado de infección por este parásito.

Las personas cuyo título serológico fue de 200, tuvieron que ser reevaluados después de cierto tiempo para la confirmación de la infección, pues se ha demostrado que a pesar que el dot-ELISA presenta una elevada sensibilidad (100%) y especificidad (95%), con un valor predictivo positivo de 90.9% y un valor predictivo negativo de 100% ⁽⁵⁾, pueden presentarse reacciones cruzadas por otras parasitosis tales como strongiloidosis, fasciolasis y teniasis, además, se debe tener en cuenta que para la realización de los ensayos no se adsorbió el suero con antígeno de ***Ascaris suum***, que ha demostrado ser un elemento importante si se desea disminuir la frecuencia de reacciones cruzadas. ⁽⁵⁾

Se han realizado estudios de seroprevalencia de toxocariosis humana en los diferentes departamentos del Perú ^(2, 3, 6, 21, 24, 25), en donde la serología fue muy

variable en comparación con los datos obtenidos en este estudio. En el cuadro 2 se muestra la frecuencia de éste parásito encontrada en los diferentes departamentos del Perú, destacándose que en los departamentos de: Ancash (85,7%), Cajamarca (85,7%), Ica (80,0%), Piura (80,0%), Junín (66,7%) y la provincia constitucional del Callao (73,7%) se encuentra la mayor frecuencia de reactividad. En los pacientes provenientes del departamento de Lima se encontró una serología reactiva en el 68,0% de los casos, lo cual se relaciona con los datos obtenidos por Huapaya et al ⁽²⁹⁾ donde la seroprevalencia para dicho estudio realizado en pacientes sintomáticos fue de 55,6%. En algunos casos la frecuencia de serología reactiva fue del 100% (Lambayeque, Apurímac, Arequipa, Cusco, Huancavelica, La Libertad y San Martín, Ucayali y Tacna) pero se tiene que considerar que existieron muy pocos pacientes provenientes de cada uno de dichos departamentos, debido a ello, no se pudo determinar la verdadera frecuencia serológica para dichos casos, se debe tener en cuenta además, que la población estudiada era sintomática lo que también pudo haber influenciado en la elevada reactividad en comparación con otros estudios donde la población fue elegida aleatoriamente (Cuadro 2)

En la población de Lima Metropolitana y Callao (Cuadro 3), se encontró que la frecuencia de personas con serología reactiva para ***Toxacara canis***, fue de 49,0% (125/255) de la población de dicha región y representa el 72,9% (186/255) de la población total del estudio. Así mismo al analizar algunos distritos como San Juan de Lurigancho, no se encuentra una elevada seropositividad a pesar de las características de la zona descrita por Castillo et al. ⁽³⁾; y también a lo descrito por Breña et ⁽²⁵⁾ quien en el mencionado distrito encontró una seroprevalencia de 46,5%, así mismo, al evaluar la frecuencia presentada en otros distritos como Breña y San

Isidro tienen una elevada frecuencia, similar a la frecuencia de contaminación de parques descrita por Chávez et al.⁽⁴⁾, al analizar los parques de Lima Oeste.

Los niños entre 1 y 4 años presentaban una elevada frecuencia de positividad (88,2%) que coincide con algunos estudios realizados ^(9, 10); así mismo el (70,6%) de personas entre 5 y 14 años también presentaban serología reactiva. (Tabla 1)

En forma general los pacientes que acudieron para el diagnóstico debido a que presentaban sintomatología ocular, especialmente disminución de la agudeza visual (cuadro 1) que corrobora los datos obtenidos por Espinoza et al ⁽²⁾ y las características reportadas por Maguiña et al ⁽²⁸⁾ y teniendo en cuenta que la edad promedio para toxocariosis ocular es de más de 8 años, se analizó la frecuencia entre las edades y la serología no encontrándose diferencias significativas en ninguno de los casos ($p < 0.05$).

Al realizar la asociación entre la serología y el lugar de procedencia se encontró una alta proporción de reactivos en Lima ciudad (chi-cuadrado = 6,58; $p < 0.05$). (Tabla 2)

Se realizó la asociación entre serología y edad, encontrándose que las personas menores de 15 años tienen mayor probabilidad de tener serología reactiva que aquellas que son mayores de 60 años. (chi-cuadrado = 5.95; $p < 0.05$). (Tabla 3)

El contacto con perros y gatos fue estadísticamente significativo (chi-cuadrado = 10.23; $p < 0.05$), (Tabla 4) en relación al contacto sólo con perros o sólo

con gatos ($p < 0.05$). Esto se relaciona con los OR obtenidos, donde se demuestra la marcada relación entre la presencia de animales y serología positiva.

Tabla 1

Frecuencia de serología para *Toxocara canis* en relación al Grupo Etáreo

	1 - 4 años		5 - 14 años		15 - 44 años		45 - 60 años		> 60 años		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Reactivo	15	88,2	72	70,6	63	68,5	23	71,9	5	41,7	178	69,8
No Reactivo	2	11,8	30	29,4	29	31,5	9	28,1	7	58,3	77	30,2
Total	17	100,0	102	100,0	92	100,0	32	100,0	12	100	255	100

Tabla 2

Chi-cuadrado de la serología para *Toxocara canis* en relación al Departamento de Lima

	Lima Ciudad		Provincias de Lima		Total	
	n	%	n	%	n	%
Reactivo	111	66,5	8	100,0	119	68,0
No Reactivo	56	33,5	0	0,0	56	32,0
Total	167	100,0	8	100,0	175	100,0

Chi- cuadrado serología Lima ciudad, provincias de Lima = 3,95

p< 0,05

g.l.: 1

TABLA 3

Serología para *Toxocara canis* con relación a la edad

	< 15 años*		15 - 60 años		> 60 años*		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Reactivo	87	73,1	86	84,3	5	41,7	178	69,8
No Reactivo	32	26,9	38	37,3	7	58,3	77	30,2
Total	119	100,0	124	121,6	12	100,0	255	100,0

* Chi-cuadrado serología edad = 5,95

p< 0,05

g.l.:1

Tabla 4

Serología para *Toxocara canis* en relación con la presencia de animales

	Perros		Gatos		Ambos*		Ninguno		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Reactivo	53	64,6	12	80,0	67	82,7	46	59,7	178	69,8
No reactivo	29	35,4	3	20,0	14	17,3	31	40,3	77	30,2
Total	82	100,0	15	100,0	81	100,0	77	100,0	255	100,0

Chi-cuadrado serología y presencia de perros 0,4

Chi-cuadrado serología y presencia de gatos 2,21

* Chi-cuadrado serología y presencia de ambos 10,23

p < 0.05, g.l.: 1

CONCLUSIONES

1. La frecuencia de anticuerpos anti-***Toxocara canis*** detectados mediante prueba dot-ELISA en pacientes que acudieron al Instituto de Medicina Tropical “Daniel A. Carrión” durante el periodo 2006 – 2008 fue del 69,8%.
2. La frecuencia de los títulos serológicos de anticuerpos anti-***Toxocara canis*** fueron 35,4% para el título de 200, de 26,4% para el título de 400, 18,5% para el título de 800, 19,1% para el título 1600 y 0,6% con título mayor a 1600.
3. Los síntomas más frecuentes presentados en la población estudiada fue la disminución de la agudeza visual, seguida por el prurito ocular interno y la visión borrosa.
4. Existe diferencia significativa entre los mayores de 60 años y los menores 15 con respecto a la serología.
5. Las personas que han tenido contacto con perros o gatos tienen mayor probabilidad de tener una serología reactiva, en relación con las personas que no han tenido contacto con este animal.

RECOMENDACIONES

1. Debido a la elevada frecuencia de ***Toxocara canis***, se deberían de implementar programas de concientización de la población, así como de controles parasitológicos de cánidos.
2. Se deben promover campañas de desparasitación de perros y gatos, porque la presencia de parásitos en estos animales condiciona la aparición de serología positiva para ***Toxocara canis***.
3. Se debe de evitar la contaminación de parques y jardines con excretas de animales pues en estos lugares es donde se desarrollan las actividades de los infantes que como se ha visto tienen una elevada frecuencia de positividad.
4. Se debe realizar un estudio en aquellos lugares que no presentaron un elevado número de casos para el presente trabajo, a fin de establecer la verdadera frecuencia para dicha región y a su vez establecer los factores de riesgo propios a la misma.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. López M, Bojanich M, Alonso J. Efecto de la exposición a *Toxocara canis* en pacientes con asma bronquial. **Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Universidad del Nordeste. 2006.**
2. Espinoza Y, Huapaya P, Sevilla C, Huiza A, Jiménez S, Náquira C. Toxocariosis humana: seroprevalencia en población de Lima mediante la técnica de ELISA. **Anales de la Facultad de Medicina. Universidad Nacional Mayor De San Marcos. 64(4): 228-232. 2003.**
3. Castillo Y, Bazán H, Alvarado D. Estudio epidemiológico de *Toxocara canis* en parques recreacionales del distrito de San Juan De Lurigancho, Lima-Perú. **Parasitol. Día. 25(3-4), p.109-114. 2001.**
4. López F, Chávez A, Casas E. Contaminación de los parques públicos de los distritos de Lima Oeste con huevos de *Toxocara sp.* **Rev. Inv. Vet Perú; 16(1):76-81. 2005.**
5. Roldán W, Cornejo W, Espinoza Y. Evaluation of the dot enzyme-linked immunosorbent assay in comparison with standard ELISA for the immunodiagnosis of human toxocariasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 101(1) Río de Janeiro. Feb. 2006.**

6. Espinoza Y, Huapaya P, Roldán W, Jiménez S, Arce Z, Lopez E. Clinical and Serological evidence of toxocara infection in school children from Morrope district, Lambayeque, Peru. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo 50(2):101-105, Marzo- Abril, 2008.**
7. Gillespie S. **Toxocara**: dogwalking and playing fields. **Br J Sports Med.; 35(1): 6–7. February 2001.**
8. Taranto N, Passamonte L, Marinconz R, De Marzi M, Cajal S. Parasitosis zoonóticas transmitidas por perros en el Chaco Salteño. **Medicina (Buenos Aires); 60: 217-220. 2000.**
9. López M, Alonso J, Bojanich M, Chamorro M, Falivene G. Aspectos inmunológicos de la infección infantil por **Toxocara canis** en el área del Gran Resistencia. Argentina. **Comunicaciones Científicas y tecnológicas. Universidad Nacional del Nordeste. 2003.**
10. López M, Fernández G, Bojanich M, Alonso J. Infección por **Toxocara canis** en población infantil vulnerable de la ciudad de Corrientes (Argentina). **Universidad Nacional del Nordeste. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. 2005.**
11. Alonso J, López M, Bojanich M, Marull J. Infección por **Toxocara canis** en población adulta sana de un área subtropical de Argentina. **Parasitol Latinoam. 59: 61 - 64, 2004**

12. Agudelo C; Villareal E; Caceres E; Lopez C; Eljach J; Ramirez N et al. Human and dogs *Toxocara canis* infection in a poor neighborhood in Bogotá. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 85(1): 75-8, jan - mar. 1990.
13. Maguiña C, Gétaz L, Samalvides F, Breña J, Torrejon D. Relación entre toxocariosis y asma: estudio prospectivo en niños del Hospital Nacional Cayetano Heredia, Lima, Perú. **Acta Med Per.** 24(2):81 – 90. 2007
14. Breña J, Huayanay L, Hernández R, Espinoza Y, Roldán W, Maguiña C. Seroprevalencia de toxacariasis en niños de Instituciones Educativas del distrito de San Juan de Lurigancho, Lima-Perú. **X Congreso Peruano de Enfermedades Infecciosas y Tropicales “Eduardo Gotuzzo Herencia”.** Septiembre 2007, Lima, Perú.
15. Roldán W, Espinoza Y, Huapaya P, Huiza A, Sevilla C, Jiménez S. Frequency of human toxocariasis in a rural population from Cajamarca, Perú determined by dot-ELISA test. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.** 51(2):67 – 71. March – April. 2009.
16. Dongil Choi, Jae Hoon Lim, Dong-Chull Choi, Seung Woon Paik, Sun-Hee Kim, Sun Huh. Toxocariasis and Ingestion of Raw Cow Liver in Patients with Eosinophilia. **Korean J Parasitol.** 46(3): 139-143, September 2008.
17. Murray P, Rosenthal K, Kobayashi G, Pfaller M. **Microbiología Médica. 4ta edición.** Madrid: Elsevier, 2003.

18. Botero D, Restrepo M. ***Parasitosis humanas. 4ta edición.*** Medellín: CIB; 2003.
19. Sommer C, Ringelstein E, Biniek R, Glockner W. Adult *Toxocara canis* encephalitis. ***Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry***; 57:229-231. 1994.
20. Yong-Hun Kim, Sun Huh, and Young-Bae Cheng. Seroprevalence of Toxocariasis among Healthy People with Eosinophilia. ***Korean J Parasitol*** 46(1): 29-32, March 2008.
21. Kasper D, Braunwald E, Fauci A, Jameson L, Longo D. ***Harrison's Principles Of Internal Medicine. 16th edition.*** United States Of America: Mc Graw Hill; 2005.
22. Abbas A, Litchman A. ***Inmunología Celular y Molecular. 5^{ta} Edición.*** Madrid- España. Elsevier. 2006.
23. Roitt I. ***Inmunología. 5ta Edición.*** Madrid- España. Harcourt- Mosby. 1998.
24. Obwaller A, Jensen-Larolim E, Auer H, Huber A, Kraft D, Aspöck H. Toxocara infestations in humans: Symptomatic course of toxocarosis correlates significantly with levels of IgE/anti IgE immune complexes. ***Parasite Immunology***. 20(7):p 311 – 317. 1998.

25. Magnaval J, Glickman L, Dorchies P, Morassin B. Highlights of human Toxocariasis. ***The Korean Journal of Parasitology* 39.(1) 1-11, March 2001.**
26. Despommier D. Toxocariasis: Clinical Aspects, Epidemiology, Medical Ecology, and Molecular Aspects. ***Clinical Microbiology Reviews*, p. 265–272. April 2003.**
27. Smith H, Holland C, Taylor M, Magnaval J, Schantz P, Maizels R. How common is human toxocariasis? Towards standardizing our knowledge. ***Trends in Parasitology*. 25 (4):182 – 188. 2009.**
28. Maguiña C, Hernández H, Gotuzzo E, Mendoza D, Echevarria J, Miranda P. Larva migrans visceral. Primer reporte en el Perú. ***Rev. Med. Her.* 2 (1): 14 – 17, 1991.**
29. Huapaya P, Espinoza Y, Ayllón C, Sevilla C, Huiza A, Jiménez S. Toxocariosis humana en pacientes con lesión ocular. ***Anales de la Facultad de Medicina. Universidad Nacional Mayor De San Marcos*. 64 (4): 247-251. 2003.**

ANEXOS

ANEXO 1

PEGADO DEL ANTIGENO PARA LA PRUEBA DE DOT-ELISA PARA EL SERODIAGNOSTICO DE TOXOCARIOSIS HUMANA

1. Depositar 2,1 μ L de antígeno TES diluído* sobre cada área de las tiras de nitrocelulosa (NC). Secar bien la punta para que salga verticalmente la gota. Se deja secar por 1 hora a 37° C
2. En una placa petri se sumerge las tiras en la solución bloqueadora (PBS conteniendo leche descremada al 5%) por toda una noche o 18 horas como mínimo a 4° C en refrigeración.
3. Se lava las tiras de NC con PBS Tween por 3 minutos en constante agitación. Secar las tiras a 37° C por 15 minutos. Estas tiras están listas para ser utilizadas o son almacenadas a -20° C en papel de aluminio en congelación.

***Nota para hacer las diluciones proceder de la siguiente manera:**

TES = Dosaje de proteínas es de 10 = 100 mg/ml = 10,000 microgramos

Se hace diluciones:

- a. 100 mgr/ml = 2 microlitros del TES + 198 de diluyente. (Diluyente ovoalbumina al 2% y buffer bicarbonato pH 9.6) = 1 ugr/ml
- b. 1 ugr/ml = 2 μ L + 198 diluyente = 0.1 ugr/ml 0.1 ugr = 20ul + 180 diluyente = 1mg/MI

Concentración final 0.1 ug/mL

ANEXO 2

PROCEDIMIENTO PARA LA PRUEBA DE DOT-ELISA PARA EL SERODIAGNOSTICO DE TOXOCARIOSIS HUMANA

1. Colocar en un ependorf 400 μ L de PBS leche al 5% y Tween 20 al 0.05% y 2 microlitros de suero (pacientes y controles).
2. Tomar 100 μ L del 1 y colocar en un ependorf que tenga 100 μ L de PBS leche y Tween, continuar con las 2 siguientes diluciones de la misma manera y así obtendremos diluciones de 1/200, 1/400, 1/800 y 1/1600.
3. En una placa petri colocar un círculo con papel de filtro o toalla humedecida y cubrirlo con un pedazo de plástico. Colocar las tiras y poner 13 μ L de la muestra diluida en cada área de las tiras e incubar tapadas a temperatura ambiente por 45 minutos. Para el control positivo se coloca 400 μ L de PBS leche + 2 μ L de suero igualmente para el control negativo.
4. Colocar en un tubo de 13 x 100 $\frac{3}{4}$ de PBS Tween introducir las tiras y lavarlas en constante movimiento por 5 minutos tres veces seguidas. Se secan las tiras entre dos papeles toalla.
5. Diluir el anticuerpo conjugado anti-IgG humano - Peroxidasa en una relación 1:1000 (1 mL de PBS leche + 1 μ L de conjugado mezclar bien con el vortex).
6. Colocar 13 μ L del conjugado diluído en cada área de las tiras de NC e incubar a Temperatura ambiente por 45 minutos.
7. Lavar las tiras con PBS conteniendo Tween 20 al 0.05% por 5 minutos tres veces seguidas. Se secan las tiras entre dos papeles toalla.

8. Sumergir las tiras de Nitrocelulosa en la solución de sustrato-cromógeno (100 μ L de Diaminobenzidina (5mg) + 10 mL de buffer citrato pH 5.0 + 10 μ L de peróxido de hidrógeno) por 5 a 10 minutos.
9. Lavar las tiras con agua destilada para detener la reacción.
10. Realizar la lectura de la reacción en cada muestra empezando a observar las tiras de Nitrocelulosa que contienen la reacción de los sueros control positivo y negativo.

REACTIVO. Cuando aparezca una reacción DOT bien marcada referida a la aparición de un círculo o mancha completo(a)

NO REACTIVO. Cuando hay ausencia de algún círculo o mancha.

NOTA IMPORTANTE

El sustrato cromógeno diaminobenzidina (DAB) puede ser previamente diluido en agua destilada a una concentración STOCK de 50 mg/mL. Cuando esto suceda, se puede utilizar sólo 100 μ L por cada 100 mL de buffer Citrato pH 5.0

PREPARACION DE REACTIVOS.

PBS leche (5 g de leche + 100 mL de PBS)

PBS Tween (PBS 10X (10 mL) + 90 mL de Agua destilada + 50 μ L de Tween 20)

CONJUGADO 1: 1000 (1 mL de PBS LECHE + 1 μ L de Conjugado)

ANEXO 3

Ficha de datos de Pacientes que acudieron al Instituto de Medicina Tropical

“Daniel A. Carrión” para el serodiagnóstico de Toxocariosis Humana

FICHA CLÍNICO - EPIDEMIOLOGICA

I. IDENTIFICACIÓN

Nombre:.....

Edad: Lugar de Nacimiento:

Lugar de Procedencia:.....

Domicilio:

Teléfono:..... Indicado por:.....

II. FACTORES DE RIESGO

Crianza de perros en el hogar: Si..... No:.....

Crianza de gatos: Si..... No:.....

III. CLINICA: MARQUE AQUEL (LOS) SÍNTOMAS QUE EL PACIENTE REFIERA. NO SUGIERA LA RESPUESTA.

Erupciones/prurito en la piel:.....

Asma:.....

Espasmo bronquial a repetición:.....

Fotofobia:.....

Disminución agudeza visual:.....

Lagrimeo:.....

Estrabismo:.....

Prurito ocular interno:

Eosinofilia:.....

Visión Borrosa y /o presencia de nubes en la visión:.....

Otros (especifique):.....

IV. RESULTADOS DEL DOT-ELISA:

REACTIVO:..... Dilución: 1/..... NO REACTIVO.....

ANEXO 4

Toxocara dot- Elisa IgG

